

学校编码: 10384

分类号 密级

学 号: 20520060153219

UDC

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

基于化学元素标签策略的蛋白质选择性识别和 绝对定量方法学研究

Methodological Studies of Selective Recognition and Absolute
Quantification of Proteins with Chemical Labeling Strategies
Based on Element-tags

徐 明

指导教师姓名: 王 秋 泉 教授

专 业 名 称: 分 析 化 学

论文提交日期: 2011 年 五 月

论文答辩时间: 2011 年 六 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席:

评 阅 人:

2010 年 5 月

目 录

摘要（中文）	i
摘要（英文）	iii
第一章 前言	1
1.1 蛋白质的物理和化学性质	1
1.1.1 蛋白质的概述	1
1.1.1.1 蛋白质的化学组成	1
1.1.1.2 蛋白质的化学结构	3
1.1.1.3 蛋白质的分类	5
1.1.1.4 蛋白质的生物功能	6
1.2 蛋白质的化学标记	7
1.2.1 蛋白质化学标记方法分类	8
1.2.1.1 天然内源氨基酸残基的标记	9
1.2.1.1.1 半胱氨酸残基的标记	9
1.2.1.1.2 赖氨酸残基及 N 端氨基的标记	11
1.2.1.1.3 酪氨酸残基的标记	13
1.2.1.1.4 其他氨基酸残基的标记	13
1.2.1.2 翻译后修饰基团的标记	13
1.2.1.2.1 磷酸化位点的标记	14
1.2.1.2.2 糖基化位点的标记	15
1.2.1.3 对基因编码修饰表达蛋白质的标记	16
1.2.1.4 利用配体/抗体亲和作用标记蛋白质	18
1.3 蛋白质的分离和检测技术	19
1.3.1 蛋白质的分离技术	19
1.3.1.1 色谱法	19
1.3.1.2 电泳法	21
1.3.2 蛋白质的检测方法	21

1.3.2.1 荧光光谱法	21
1.3.2.1.1 原子荧光光谱法	22
1.3.2.1.2 分子荧光光谱法	23
1.3.2.2 质谱法	24
1.3.2.2.1 分子质谱法	25
1.3.2.2.2 元素质谱法	27
1.4 本论文的选题及研究工作内容	29
1.5 参考文献	30
第二章 人体血浆中硒蛋白质的检测和定量	49
2.1 建立ICP-DRC-qMS测定⁸⁰Se分析平台	51
2.1.1 仪器和试剂	51
2.1.2 动态反应池的优化	52
2.1.3 结果分析和讨论	52
2.2 SeIP的提纯和鉴定	54
2.2.1 仪器和试剂	54
2.2.2 SeIP的提纯和分析	55
2.2.3 结果分析和讨论	56
2.3 利用AEC/ICP-DRC-qMS 分析人血浆中的硒蛋白质	58
2.3.1 仪器和试剂	58
2.3.2 AEC分离硒标准物质和血浆样品	58
2.3.3 结果分析和讨论	59
2.4 利用柱后同位素稀释法对人血浆中硒蛋白质定量分析	61
2.4.1 仪器和试剂	61
2.4.2 柱后SUID定量血浆中的硒蛋白质	62
2.4.3 结果分析和讨论	62
2.5 参考文献	65
第三章 高通量标记金属蛋白质的元素标签筛选方法	70

3.1 金属硫蛋白的分析和鉴定	72
3.1.1 仪器和试剂	72
3.1.2 分析鉴定金属硫蛋白MT-2	73
3.1.3 结果分析和讨论	74
3.2 建立筛选金属离子标记MT-2蛋白质的方法	77
3.2.1 仪器和试剂	78
3.2.2 分析金属离子标记MT-2	78
3.2.3 结果分析和讨论	78
3.3 建立有机金属化合物标记MT-2蛋白质的方法	82
3.3.1 仪器和试剂	82
3.3.2 分析有机汞化合物标记金属硫蛋白MT-2	83
3.3.3 结果分析和讨论	83
3.4 参考文献	87
第四章 利用有机汞标签实现对蛋白质的标记和绝对定量	90
4.1 有机汞标签标记蛋白质化学行为研究	91
4.1.1 仪器和试剂	92
4.1.2 分析和比较有机汞标签标记蛋白质的化学行为	93
4.1.3 结果分析和讨论	94
4.2 CH₃Hg-THI和CH₃²⁰⁴Hg-THI标签的合成	111
4.2.1 仪器和试剂	111
4.2.2 CH ₃ Hg-THI和CH ₃ ²⁰⁴ Hg-THI标签的合成与鉴定	112
4.2.3 结果分析和讨论	113
4.3 动态标记蛋白质并利用同位素稀释法实现绝对定量	117
4.3.1 仪器和试剂	118
4.3.2 蛋白质的标记、鉴定和定量	118
4.3.3 结果分析和讨论	119
4.4 参考文献	124

第五章 利用有机汞标签选择性标记和识别蛋白质	127
5.1 利用CH₃Hg-THI标签标记并识别SeCys和GPx1	128
5.1.1 仪器和试剂	130
5.1.2 利用CH ₃ Hg-THI标签标记并识别SeCys和GPx1	130
5.1.3 结果分析和讨论	131
5.2 利用CH₃Hg-THI标签标记和识别富硒酵母菌中硒蛋白质	139
5.2.1 仪器和试剂	140
5.2.2 利用CH ₃ Hg-THI标签分析富硒酵母提取液中的蛋白质	140
5.2.3 结果分析和讨论	141
5.3 参考文献	144
第六章 总结与展望	146
6.1 总结	146
6.1.1 建立了定量检测人体血浆中硒蛋白质的方法	146
6.1.2 建立了高通量的化学标签的筛选并用于金属蛋白质标记的方法	146
6.1.3 建立了有机汞探针对蛋白质的标记和绝对定量的方法	147
6.1.4 建立了有机汞探针选择性标记和识别硒蛋白质的方法	147
6.2 展望	149
6.3 参考文献	151
在校期间已发表和待发表的论文	153
致谢	155

CONTENTS

Abstract (Chinese)	i
Abstract (English)	iii
Chapter 1 Preface	1
1.1 The Physical and Chemical Property of Protein	1
1.1.1 Introduction of protein	1
1.1.1.1 Chemical composition of protein	1
1.1.1.2 Chemical structure of protein	3
1.1.1.3 Class of protein	5
1.1.1.4 Biological function of protein	6
1.2 Chemical Labeling Strategy for Protein	7
1.2.1 Class of chemical labeling strategy for protein	8
1.2.1.1 Labeling natural amino acids in protein	9
1.2.1.1.1 Labeling cysteine residue	9
1.2.1.1.2 Labeling lysine residue and the N terminal	11
1.2.1.1.3 Labeling tyrosine residue	13
1.2.1.1.4 Labeling other residues	13
1.2.1.2 Labeling the post-translation modifications	13
1.2.1.2.1 Labeling phosphoprotein	14
1.2.1.2.2 Labeling glycoprotein	15
1.2.1.3 Labeling the gene-coded peptide tag	16
1.2.1.4 Coordination affinity or immuno-reaction specificity	18
1.3 The Separation and Detection Technique for Protein	19
1.3.1 Separation technique	19
1.3.1.1 Chromatography	19
1.3.1.2 Electrophoresis	21
1.3.2 Detection technique	21

1.3.2.1 Fluorescence spectroscopy	21
1.3.2.1.1 Atomic fluorescence spectroscopy	22
1.3.2.1.2 Molecular fluorescence spectroscopy	23
1.3.2.2 Mass spectrometry	24
1.3.2.2.1 Molecular mass spectrometry	25
1.3.2.2.2 Elemental mass spectrometry	27
1.4 Research Proposal	29
1.5 References	30
Chapter 2 Quantification of Selenoproteins in Human Plasma	49
2.1 The Analytical Platform for Measuring ⁸⁰Se	51
2.1.1 Instruments and reagents	51
2.1.2 Optimization of DRC	52
2.1.3 Result and discussion	52
2.2 The Purification and Identification of SeP	54
2.2.1 Instruments and reagents	54
2.2.2 The purification and identification of SeP	55
2.2.3 Result and discussion	56
2.3 Analysis of Selenoproteins in Human Plasma with AEC/ICP-DRC-qMS	58
2.3.1 Instruments and reagents	58
2.3.2 Separation of Se standards and samples	58
2.3.3 Result and discussion	59
2.4 Quantification of Selenoproteins in Human Plasma with SUID Strategy	61
2.4.1 Instruments and reagents	61
2.4.2 Quantification of selenoproteins in human plasma with SUID strategy	62
2.4.3 Result and discussion	62
2.5 References	65
Chapter 3 Method for Screening Element-tag for metalloprotein	70

3.1 Analysis of MT-2	72
3.1.1 Instruments and reagents	72
3.1.2 Analysis of MT-2	73
3.1.3 Result and discussion	74
3.2 Labeling MT-2 with Inorganic Metal Ions	77
3.2.1 Instruments and reagents	78
3.2.2 Labeling MT-2 with inorganic metal ions	78
3.2.3 Result and discussion	78
3.3 Labeling MT-2 with Metallo-organic Compounds	82
3.3.1 Instruments and reagents	82
3.3.2 Labeling MT-2 with organic Hg compounds	83
3.3.3 Result and discussion	84
3.4 References	87
Chapter 4 Absolute Quantification of Proteins with Organic Hg Tag	90
4.1 Analysis of Chemical Labeling Behavior of Organic Hg Tags	91
4.1.1 Instruments and reagents	92
4.1.2 Analysis of chemical labeling behavior of organic Hg tags	93
4.1.3 Result and discussion	94
4.2 Synthesis of CH₃Hg-THI and CH₃²⁰⁴Hg-THI Tags	111
4.2.1 Instruments and reagents	111
4.2.2 Synthesis and identification of CH ₃ Hg-THI and CH ₃ ²⁰⁴ Hg-THI tags	112
4.2.3 Result and discussion	113
4.3 Dynamically Labeling and Absolutely Quantifying Model Proteins with SSID Strategy	117
4.3.1 Instruments and reagents	118
4.3.2 Labeling and quantifying model proteins	118
4.3.3 Result and discussion	119

4.4 References	124
Chapter 5 Selectively Labeling and Recognizing Selenoproteins with Organic Hg Tag	127
5.1 Labeling SeCys and GPx1 with CH₃Hg-THI Tag	128
5.1.1 Instruments and reagents	130
5.1.2 Labeling SeCys and GPx1 with CH ₃ Hg-THI tag	130
5.1.3 Result and discussion	131
5.2 Labeling and Screening Selenoproteins in Se Enriched Yeast Extract with CH₃Hg-THI Tag	139
5.2.1 Instruments and reagents	140
5.2.2 Labeling Se enriched yeast extract with CH ₃ Hg-THI tag	140
5.2.3 Result and discussion	141
5.3 References	144
Chapter 6 Conclusion and Perspective	146
6.1 Conclusion	146
6.1.1 Method for quantifying selenoproteins in human plasma	146
6.1.2 Method for searching elemental tags to label metalloprotein	146
6.1.3 Method for absolutely quantifying proteins with organic Hg tag	147
6.1.4 Method for labeling and screening selenoproteins with organic Hg tag	147
6.2 Perspective	149
6.3 References	151
Published and Unpublished Papers	153
Acknowledgement	155

摘要

作为后基因组时代的蛋白质组学研究与基因组学研究相比是一项更具挑战性的研究工作。蛋白质组学研究不仅要关注生物体系中蛋白质的种类，而且要提供这些蛋白质的含量信息。只有获得生物体系中蛋白质的这些信息，才能够充分理解生命过程的机制，进而为疾病的诊断和相关治疗药物的研发提供理论和技术支撑。在蛋白质组学研究的进程中，新的分析技术和相应的分析方法学的发展是解决复杂生物体系中蛋白质分析所面临的新问题的有效途径。在近年来所发展的多种分析技术和方法中，质谱技术逐渐成为蛋白质组学研究的主流技术。分子质谱具有强大的结构分析能力，能够鉴定蛋白质的种类并可提供不同样品中蛋白质相对丰度的信息；作为目前最好的元素分析技术，元素质谱（特别是电感耦合等离子质谱，ICP-MS）可通过蛋白质含有的内源元素或者外源标记元素的准确测定，并与分离技术或专一性的识别方法相结合，实现对蛋白质的丰度分析和绝对定量。两者的联合应用为蛋白质组学研究提供了一个强大的分析平台。在应用质谱技术特别是ICP-MS进行蛋白质的丰度分析和绝对定量时，合适的元素标签不但是实现上述目标的“桥梁”，而且可极大地提高蛋白质分析的选择性和灵敏度。基于ICP-MS的多元素和多同位素分析能力，同位素稀释策略为更准确的蛋白质绝对定量分析提供了保障。

针对蛋白质的选择性识别和绝对定量分析，我们发展了多种基于元素标签的蛋白质质谱分析策略，将在本博士论文中一一阐述。主要研究工作共分为以下六个部分：

第一章，对蛋白质的相关背景知识进行了介绍，并对近几年来蛋白质分析技术和方法的发展进行了回顾和概述。

第二章，建立了阴离子交换色谱（AEC）与配备“动态反应池”（DRC）的ICP-MS联用的分析平台（AEC/ICP-DRC-MS）；发展了基于蛋白质内源元素标签策略的人血浆中硒蛋白质（硒蛋白P和谷胱甘肽过氧化物酶）和含硒蛋白质（含硒血清白蛋白）的定量新方法，并结合柱后同位素稀释技术实现了人血浆中硒蛋白和含硒蛋白的绝对定量。

第三章，以金属硫蛋白为模型蛋白质，研究三个金属组（“Fe、Co、Ni、

Cu、Cd”，“Ru、Rh、Pd、Ir、Pt、Au”和“La、Ce、Pr、Nd、Sm、Eu、Gd、Tb、Dy、Ho、Er、Tm、Yb”）与其相互作用规律。籍此实现对元素标签简单和高效的筛选和比较，为选择稳定和专一标记蛋白质的元素标签提供了一个系统的研究平台。

第四章，详细并系统地研究了有机汞元素标签(CH_3Hg^+ , $\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$, $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_2\text{Hg}^+$ 和 $\text{C}_{20}\text{H}_7\text{O}_5\text{Br}_2\text{Na}_2\text{Hg}^+$)对两种模型蛋白质(β -乳球蛋白和卵清白蛋白)的标记行为，并比较了这些标签的分子尺寸效应对蛋白质分子标记效率和构象稳定性的影响。最终我们设计合成了硫代甲基汞水杨酸钠及其 ^{204}Hg 同位素标签($\text{CH}_3\text{Hg-THI}$ 和 $\text{CH}_3^{204}\text{Hg-THI}$)，并用于蛋白质的动态标记；通过尺寸排阻色谱(SEC)与ICP-MS联用(SEC/ICP-MS)，结合柱前同位素稀释技术，实现了模型蛋白质的绝对定量分析。

第五章，发展了利用 $\text{CH}_3\text{Hg-THI}$ 标签识别和检测硒蛋白质的“双元素标签”分析策略。利用硒代半胱氨酸和谷胱甘肽过氧化酶研究了 $\text{CH}_3\text{Hg-THI}$ 和 $-\text{SeH}$ 基团之间的选择性，然后利用 $\text{CH}_3\text{Hg-THI}$ 标记了富硒酵母的提取液，通过反相色谱(RP-HPLC)和 ICP-MS 联用(RP-HPLC/ICP-MS)对富硒酵母中潜在的硒蛋白质进行了筛选和分析。

第六章，总结了本论文研究工作所取得的进展和有待进一步开展深入研究工作，并对这一研究领域未来的发展进行了展望。

关键词：蛋白质；硒；汞；元素标签；化学标记；电感耦合等离子体质谱；同位素稀释；蛋白质绝对定量

Abstract

Comparing with the genomics, the proteomics is a more challenging task in the post-genomics age, in which the information concerning not only how many protein species but also how much of them are present in a proteome in a given biological system is not only necessary to understand the process and mechanism of life, but also crucial for diagnosis of a disease as well as for subsequent research and development of a corresponding biomedicine. In order to solve the new problems emerged in proteomics research (such as numerous kinds and types of proteins in a cell and great difference of up to 10 orders of magnitude in abundance), new analytical techniques and corresponding novel strategies are urgently needed. These developments are believed to be an efficient way to perform an accurate protein analysis. Among various analytical techniques and methods developed in recent years, mass spectrometry (MS) has become a central analytical technique for proteomics research. Molecular MS is a very effective for structural identification of proteins in a biological system, and also for relative protein abundance assay. Elemental MS (especially inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS), which is the best element analysis technique so far available, can realize the protein abundance screening and absolute protein quantification via measuring the endogenous heteroatoms in the protein molecules and/or exogenous heteroatoms labeled onto the proteins when coupled with an effective separation technique or a protein-specific recognition route. Especially with chemistry-or biology-based labeling strategies, the selectivity and sensitivity of protein analysis can be significantly improved when using molecular and elemental MS together. The absolute quantification of proteins can be achieved using ICP-MS together with isotope dilution because of its smart capability of multi-elements/isotopes analysis.

In this thesis, we developed several novel strategies based on endogenous element-tag and/or exogenous element-tag, which was labeled onto the proteins, in order to selectively recognize and absolutely quantify the proteins. These will be described in six chapters:

Chapter 1, background knowledge of proteins and recent development of techniques and methods for protein analysis are briefly introduced and reviewed.

Chapter 2, based on endogenous selenium tag, a new method for quantifying the selenoproteins (selenoprotein P and glutathione peroxidase) and Se-containing protein (selenoalbumin) in human plasma was developed using ICP-DRC-MS together with anion exchange chromatography. A species-unspecific isotope dilution strategy was successfully employed for the absolute quantification of the three proteins.

Chapter 3, the metallothioneins-2 is used as a model protein to study its interaction with three metallomes (“Fe、Co、Ni、Cu、Cd”, “Ru、Rh、Pd、Ir、Pt、Au” and “La、Ce、Pr、Nd、Sm、Eu、Gd、Tb、Dy、Ho、Er、Tm、Yb”). The developed analysis platform allows screening most efficient element-tag for specific labeling target protein, and paves a new way not only for metallomics study but also for protein analysis using ICP-MS.

Chapter 4, based on a systematic study of the label-behavior of a series of mono-functional organic Hg tags including CH_3Hg^+ , $\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$, $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_2\text{Hg}^+$ and $\text{C}_{20}\text{H}_7\text{O}_5\text{Br}_2\text{Na}_2\text{Hg}^+$ towards two model proteins (β -lactoglobulin and ovalbumin), we designed and synthesized sodium methylmercurythiosalicylate and its ^{204}Hg -enriched analogue (CH_3Hg -THI and $\text{CH}_3^{204}\text{Hg}$ -THI) for dynamically labeling the proteins (avoiding the use of toxic CH_3Hg^+) to achieve protein absolute quantification using ICP-MS coupled size-exclusion chromatography with a species-specific isotope dilution strategy.

Chapter 5, a dual-element labeling strategy was developed for screen and determination of potential selenoproteins in Se-enriched yeast using ICP-MS. The specific chemical selectivity between CH_3Hg -THI tag and $-\text{SeH}$ group was validated with selenocysteine and glutathione peroxidase. Water-soluble extract of Se-enriched yeast was then labeled with CH_3Hg -THI, and the potential selenoproteins were screened and analyzed based on the signals of Hg and Se using RP-HPLC/ICP-MS.

Chapter 6, a conclusion of what I have achieved during my doctoral studies and a perspective of future development in this field are presented.

Keywords: Protein; Selenium; Mercury; Element-Tag; Chemical Labeling Strategy; Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry; Isotope Dilution; Protein Absolute Quantification

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 前言

1.1 蛋白质的物理和化学性质

蛋白质的英文是protein，源于希腊文的proteios，是“头等重要”意思。蛋白质这一概念最早由瑞典化学家Jöns Jakob Berzelius于1838年提出。之后关于蛋白质的定义和认识不断丰富和发展，才有了我们今天对于蛋白质的整体概念。蛋白质是生命体中最重要生物分子，它在化学组成、分子结构和生物功能等方面都具有其他生物分子所不具备的特点。作为生命的基础，对于蛋白质的研究是解释生物起源、物种产生、生命进化的关键所在。进入二十一世纪，随着人类基因组图谱的基本完成^[1, 2]，越来越多的研究开始转移到蛋白质领域^[3-5]。因为人们意识到虽然可以通过基因片段对蛋白质进行预测，但是这种预测在缺乏实验证据的基础上往往是没有实际意义的。因为蛋白质的表达与否受生命成长和外部环境等多种因素的影响，完全有可能在同一个体的不同发育阶段有不同的生理状态。而且蛋白质的表达状态、体内分布、相对含量等信息都是无法根据基因信息获取的。随着蛋白质研究的不断系统化，蛋白质的研究方向和分支也不断增加，如蛋白质的表达、蛋白质的结构鉴定、蛋白质的功能改造、蛋白质的定量等等。随着分析技术和方法的发展，在未来很长一段时间内，蛋白质的研究会更加深入，并成为生命科学中最热门的领域之一。作为研究基础，应用化学方法来检测和识别蛋白质的优势是其他研究方法所不能取代的，所以本论文首先对蛋白质的化学特征进行概述和总结。

1.1.1 蛋白质的概述

1.1.1.1 蛋白质的化学组成

在元素周期表天然存在的元素中，除了第八主族元素（He、Ne、Ar、Kr、Xe）以外，几乎每种元素都可以在生物体中发现。这些元素进入生物体的途径，及发挥有益或者有害功能的过程，蛋白质都会参与其中。组成蛋白质的基本元素主要包括碳（C）、氢（H）、氧（O）、氮（N）和硫（S）五种。除了这五种

基本元素以外，在蛋白质翻译后修饰的过程中，磷（P）也会通过磷酸化的过程被共价修饰在蛋白质分子上。在硒蛋白质中，硒（Se）会选择性的取代 S，形成活性很高的酶催化中心或者提供体内 Se 的储存及运输途径。除了这些非金属元素，在金属蛋白质中，蛋白质的配位中心会通过静电力作用结合不同种类金属元素（如 Zn、Cu、Ni、Co、Fe、Mn、Mg、Na、Ca 等），组成蛋白质结构的重要部分。以上这些都是生物体必需的元素，当生物体处于某些污染环境下，一些有害的金属（如 Hg、Cd、As、Pb 等）也会进入组织或者细胞，与特定的蛋白质形成稳定的共价或配位结构，实现解毒的目的。在极端的特殊环境中，一些生物体还会进化出对某种或某一类元素形成富集和适应的机制，自身合成一些相应的蛋白质。与核酸、糖类或者脂类化合物不同，蛋白质与金属或者非金属离子及化合物的这些特殊联系足以体现它自身的复杂性和多功能性。

蛋白质的基本化学结构单元是氨基酸，通常蛋白质分子由 20 种基本氨基酸组成，它们分别是：甘氨酸（glycine, Gly）、丙氨酸（alanine, Ala）、丝氨酸（serine, Ser）、苏氨酸（threonine, Thr）、半胱氨酸（cysteine, Cys）、缬氨酸（valine, Val）、亮氨酸（leucine, Leu）、异亮氨酸（isoleucine, Ile）、甲硫氨酸（methionine, Met）、脯氨酸（proline, Pro）、苯丙氨酸（phenylalanine, Phe）、酪氨酸（tyrosine, Tyr）、色氨酸（tryptophan, Trp）、天冬氨酸（aspartic acid, Asp）、谷氨酸（glutamic acid, Glu）、天冬酰胺（asparagine, Asn）、谷氨酰胺（glutamine, Gln）、组氨酸（histidine, His）、赖氨酸（lysine, Lys）、精氨酸（arginine, Arg），它们的化学结构如图 1-1 所示。这些氨基酸中都含有一个 α -氨基（ $-\text{NH}_2$ ）和一个 α -羧基（ $-\text{COOH}$ ），彼此之间通过形成肽键（ $-\text{CO}-\text{NH}-$ ）相互连接，形成线性的肽链结构，也就是蛋白质的基本骨架。由于键和在蛋白质分子中的这些氨基酸结构单元并不完整，一般称为氨基酸残基。各氨基酸残基所携带的侧链化学基团各不相同，具有不同的亲电性和亲核性，使不同种的蛋白质分子具有不一样的化学结构特征和反应活性。

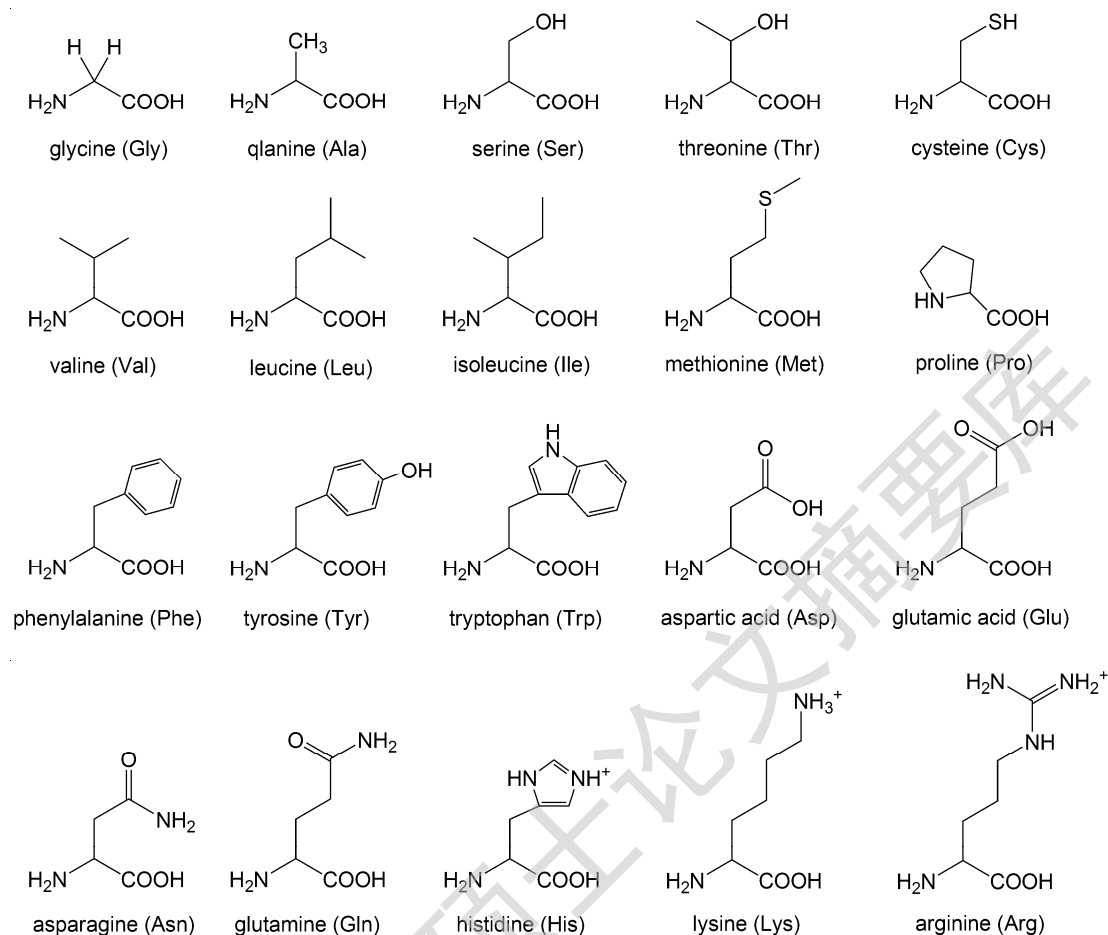


Fig. 1-1 Chemical structures of 20 basic amino acids.

图 1-1 20 种基本氨基酸的化学结构式

1.1.1.2 蛋白质的化学结构

蛋白质之所以具有多样的种类和功能，与它们自身的结构特点是紧密相关的。与其他生物大分子不同，每种蛋白质分子都有其独一无二的结构，而且这些结构在不同的化学环境和条件下还会发生相应的变化，实现改变分子化学反应活性并调节生物化学反应平衡目的^[6]。在生理条件下，蛋白质分子会处于它们最稳定的天然构象状态，这种三维结构的维持是以很多结构因素为基础的。

蛋白质的结构主要分为一级结构，二级结构，三级结构和四级结构^[7]。所谓蛋白质的一级结构就是指蛋白质肽链中氨基酸残基的排列顺序，也被称为氨基酸残基序列。这种由氨基酸缩合形成的线性结构由生物的基因信息控制，通过转录翻译等过程在生物体内合成。对于特定的蛋白质种类，它的 cDNA 序列是固定

不变的，除非在某些情况下个体发生基因突变。蛋白质分子的两端分别具有一个 α -氨基和一个 α -羧基，通常把具有 α -氨基的一端定义为N端，把具有 α -羧基的一端定义为C端。

蛋白质的二级结构是由蛋白质分子一级序列中肽键间的(C=O)上的氧原子和亚胺基(N-H)上的氢原子形成的氢键，并通过这些氢键使蛋白质分子维持稳定的构象。二级结构主要由 α 螺旋、 β 折叠、转角和无规则卷曲组成。由于它的化学结构基础是氢键，所以蛋白质的二级结构是非常脆弱而且容易受到外部环境影响的。如在pH条件改变或者遇到强亲核试剂时，蛋白质天然的二级结构的组成就会发生改变，有序的 α 螺旋、 β 折叠和转角就可能发生相互间的转变，或者被破坏变成无规则的卷曲，丧失蛋白质自身的天然构象。

蛋白质的三级结构就是肽链中所有肽键和氨基酸残基间的相对位置，这些相对的位置可以用肽键的两面角和一些原子（或基团）间的距离定量地加以描述。由于生物体内的生理溶液环境通常是极性的，因而蛋白质分子的表面通常也是极性的，而核心部分是通过疏水作用形成稳定的结构。其他属于三级结构的主要作用还有盐桥、氢键和二硫键。这些结构所形成的综合的非共价键和疏水作用使蛋白质分子的三维结构处于稳定状态。另外，在形成蛋白质的三级结构时，一些金属离子是三级结构的形成和稳定是必不可少的。其他的还有糖链，磷酸化基团等等，都会对三级结构的形成产生不同的影响。

蛋白质的四级结构可以视为一些特定的三级结构的肽链通过非共价键而形成大分子体系的组合方式。作为蛋白质四级结构组分的肽链被定义为亚基。通常在亚基之间不存在共价键，亚基间的相互作用都是通过非共价键形成的。按照亚基的数目可以把蛋白质分为寡聚和多聚。按照亚基的种类也可以把蛋白质分为相同亚基和不同亚基组成的两类。

以上这些蛋白质的结构特征是蛋白质分子组成的基本要素，除了自身的化学元素成分和成键方式，其实更多的生物化学功能是由它们分子所形成的独特化学性质的三维空间构象所决定的。如蛋白酶与底物的识别，就是借助于由蛋白质分子折叠过程，将一系列的化学基团进行特殊的排列组合，形成对底物具有很高亲和性的“空穴”结构，以实现与底物的选择性结合，完成必要的催化功能。

1.1.1.3 蛋白质的分类

通过归纳蛋白质分子的成分和结构特点,可以将它们系统的分类,实现针对性的研究。

根据蛋白质的元素组成可以将蛋白质分为含有杂原子的蛋白质和不含杂原子的蛋白质,通常含有杂原子的蛋白质中都含有一个或多个杂原子(非 H, C, O, N, P, S 原子)^[8]。如血红蛋白(hemoglobin),它是高等生物体内负责运载氧的一种蛋白质,血红蛋白使血液呈现血红色,它由四条链组成,两条 α 链和两条 β 链,每一条链有一个包含一个铁原子的环状血红素。氧气结合在铁原子上,被血液运输。除了金属杂原子,一些特殊的蛋白质也会携带非金属杂原子。如碘甲腺原氨酸脱碘酶(iodothyronine deiodinase),存在于肝、肾、甲状腺和垂体中,它的分子中含有硒原子,是可以催化甲状腺激素分子脱碘的一类酶。大部分含有杂原子的蛋白质都起到重要的储存和运载微量元素,或催化生物化学反应的功能。

蛋白质也可以根据其三级结构特征分为球蛋白质、纤维蛋白质和膜蛋白质^[7]。绝大多数蛋白质的肽链折叠成为近乎球状的结构,球状结构的外部是极性的,内部是非极性的,所以几乎所有的球蛋白质都是水溶性的,大部分的酶蛋白都是球蛋白质。和球蛋白质相比,纤维蛋白质的结构相对简单,因为它们很少有转角、环状和无规则的卷曲等二级结构,整条肽链几乎是单一的二级结构,这类蛋白质主要在生物体内起到结构和支撑的作用,包括丝蛋白、角蛋白和胶原蛋白等。膜蛋白质有多种类型,有附着在生物膜表面的、有嵌入膜脂的、有穿越膜的等等。膜蛋白质的稳定性主要由氢键和范德华力来维持,与球蛋白质不同,它们不具备疏水的核心。膜蛋白质常常作为受体或分子通道,是细胞与外界联系的重要介质。

为了方便蛋白质研究,也会将某些具有相同或类似结构、体内分布和生理功能等特点的蛋白质作为一个研究目标的集合。如以某种生物体、细胞或组织内的含 Zn 蛋白质作为研究对象时,就可能包含几种或几十种含 Zn 蛋白质。当以蛋白质分子中的某些翻译后修饰基团为研究目标时,如磷酸化基团,所研究的蛋白质就会扩展到几百到几千种。当以某种组织细胞内的蛋白质为研究对象时,如神经细胞内的蛋白质,所要研究的蛋白质就会扩展到上万种。由此应运而生“蛋白质组(Proteome)”的概念,这个概念最早是由 Marc Wilkins 在 1996 年正式发

表的论文中提出^[9]。随后，在 1997 年“蛋白质组学（Proteomics）”的概念也被提出^[10]。当然对于不同的研究者，对蛋白质组学概念的理解也会多少有一些差异。不论如何，各种分类方法都是为了方便研究者对于蛋白质的归纳和认识，从而说明它们所共同具备的物理和化学特性。

1.1.1.4 蛋白质的生物功能

蛋白质在分子水平和细胞水平参与各种生理和病理过程，发挥各种各样的功能。作为生物体的直接工具，与多种生物分子发生相互作用，调节它们的合成和代谢，如核酸、糖类和脂质。正因为扮演着这么重要的角色，蛋白质的功能也一直是蛋白质研究的重点。

蛋白质作为信息分子和信号的传导分子，包括激素、生长因子、细胞因子。通过各种配体/受体作用形成信号传导的途径，作用于基因，引起某些蛋白质的表达。通过这些蛋白质的表达实现细胞的增殖、生长和凋亡，或对整个生命体的整体状态的平衡进行调节，对外部环境带来的刺激作出应答，如胰岛素、生长激素、甲状腺激素等。

蛋白质具有催化和转化功能，这类蛋白质称作酶类。蛋白酶主要起到6种生理功能：氧化还原、基因转移、异构、水解、裂合和连接功能。通过这些反应机制实现对生物分子的转化、降解、合成和修饰。这些反应如果在没有蛋白酶的环境下几乎是不能进行的，正因为蛋白酶所具有独特的活性中心，成为加速这些生化反应的催化剂，如胰蛋白酶、谷胱甘肽过氧化酶等。

蛋白质的防卫和保护功能是生物体进行自我保护的一项基本功能。免疫系统通过分泌免疫球蛋白对侵入体内的病毒等进行攻击，保护细胞不受破坏。蛋白质还是重要的分子和物质运载体，承担了很多种重要激素和金属离子的运输功能，实现它们在生物体内的分配和平衡。载体蛋白质几乎无处不在，如血浆中的转铁蛋白和白蛋白。细胞质膜上的膜转运蛋白，控制着细胞对外部物质的吸收和向外释放物质。蛋白质还起到结构和支撑功能，维持生物体的基本形态，如胶原蛋白和肌肉蛋白。通常这些蛋白质作为基本的生物组织存在，控制生物体的形貌和运动。除了已知的各种蛋白质的生理功能，生物体还会在极端条件下进化出某些蛋白质来适应环境，发挥特定的作用。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”. Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库